

A hippokampális szemcsesejtek különleges fiziológiai sajátosságainak vizsgálata

Ph.D. értekezés
Neubrandt Máté

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető:

János Szabadics Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

Kozsurek Márk, Ph.D., egyetemi adjunktus

Molnár Gábor, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság tagjai:

Kamondi Anita, DSc., egyetemi tanár

Gerber Gábor, CSc., egyetemi docens

Rácz Bence, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2017

1. Bevezetés

A hippocampusz egy minden emlősben megtalálható agyterület, amely olyan összetett kognitív funkciókban vesz részt, mint például az epizodikus memória folyamatok és a térbeli tájékozódás. A hippocampusz hálózatának felépítése és működése sok szempontból nagyon hasonlít más agykérgi területekhez. Emellett a hippocampusznak van néhány egyedi anatómiai és fiziológiai sajátossága is, amelyek hozzájárulnak egyedi funkcióihoz. Annak ellenére, hogy a hippocampusz az elmúlt évtizedek során az egyik legintenzívebben kutatott agyterületté vált, számos egyedi jellegzetességéről még ma is keveset tudunk. Ph.D. munkám során a hippocampusz egyik sejtípusának, a *gyrus dentatus* szemcsesejtjeinek különleges működését vizsgáltam.

A legtöbb idegsejt típussal ellentétben, melyek képződése kizárólag az embrionális kora tehető, a szemcsesejtek a teljes posztnatális élet során is folyamatosan születnek és épülnek be a hippocampusz hálózatába. A felnőttkorban született szemcsesejtek fejlődésük során (patkányban) körülbelül 3. héttől kezdve tekinthetők a hálózatba már beépült, teljes értékű

idegsejteknek. Az ezt követő időszakban (3-10. hét) a sejtek egy további érési folyamaton mennek keresztül, mialatt fiziológiai tulajdonságaik folyamatosan változnak. Számos eredmény utal arra, hogy a felnőtt korban született *fiatal* szemcsesejtek különböző élettani szerepet tölthetnek be, mint a már *érett* szemcsesejtek. Általánosan elfogadott az a hipotézis, miszerint a fiatal sejtek eltérő serkenthetősége fontos szerepet játszhat eltérő funkciójukban. Kutatómunkám kezdetekor nem állt rendelkezésre adat arra vonatkozóan, hogy a fiziológiai tulajdonságok folyamatos érése hogyan teszi lehetővé diszkrét funkcionális állapotok fenntartását. Doktori munkám első szakaszában ezért azt vizsgáltuk, hogy a felnőtt korban született és a hippocampusz hálózatába már beépült szemcsesejtek érése során hogyan történik meg a *fiatal* és *érett* funkcionális állapotok közötti váltás.

A szemcsesejtek *in vivo* aktivitása szintén egyedi tulajdonságaik közé tartozik. Átlagos aktivitásukat tekintve (ami kevesebb mint 1 Hz), ők az egyik legcsendesebb neuronok. Amikor azonban a szemcsesejtek aktívak, egyedi akciós potenciálok (AP) mellett tüzelhetnek rövid, nagy frekvenciájú AP

sorozatokat, úgynevezett 'burst'-öket (3-7 AP, 100-200 Hz). Ilyen 'burst' tüzelés figyelhető meg például akkor, ha az állat belép a tér azon pontjára, ami az adott szemcsesejt úgynevezett hely-mezeje ('place field'). A szemcsesejtek jellegzetes axonjait moharostoknak hívjuk, ezek a CA3 régióba vetítenek. Összhangban a moharost szinapszisok komplex működésével, számos rövid- és hosszútávú plaszticitási jelenséget írtak le bennük, ezeket azonban általában hosszan tartó, a fiziológiás aktivitásnál jóval intenzívebb stimulus protokollokkal váltották ki. Ugyanakkor kevésbé ismert a moharostok szinaptikus működése a fiziológiásan releváns aktivitási mintázatok során. Nem volt ismert például, hogy a szemcsesejtek egyszeri rövid 'burst' aktivitása kivált-e valamilyen plaszticitási jelenséget.

2. Célkitűzések

Ph.D. munkám első felében azt vizsgáltam, hogy felnőttkorban született fiatal és a már érett szemcsesejtek hogyan tölthetnek be különböző funkciót. A következő specifikus kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan változnak a felnőttkorban született szemcsesejtek különböző fiziológiai tulajdonságai az érés során?
- Milyen specifikus fiziológiai tulajdonságok teszik lehetővé, hogy a szemcsesejteket különböző funkcionalitású populációkra bontsuk?
- Mikor és hogyan válnak a felnőttkorban született szemcsesejtek *fiatal*-ról *érett* funkcionális állapotba a fejlődésük során?

Ph.D. munkám második felében a moharostokban működő szinaptikus mechanizmusokat vizsgáltam fiziológiásan releváns aktivitásmintázatok közben:

- Rövid, valóban fiziológiás ‘burst’ aktivitás aktivál-e különböző szinaptikus plaszticitási mechanizmusokat, összehasonlítva az egyedi AP tüzeléssel?
- A CA3 hálózat hogyan értelmezi a szemcsesejtek olyan összetett aktivitásmintázatait, melyek egyedi AP-t és rövid, nagy frekvenciájú ‘burst’ tüzelést, valamint hosszabb inaktív periódusokat is tartalmaznak?

3. Módszerek

Az elektrofiziológiai méréseket *in vitro*, túlélő agyszeleteken végeztem, melyeket felnőtt (a felnőttkorban született szemcse sejtek esetében, 51-105 napos korú), vagy fiatal (a moharostok szinaptikus tulajdonságainak vizsgálata esetében 21-45 napos korú) Wistar patkányokból készítettünk. A sejteket infravörös (900 nm) Nomarski differenciál interferencia kontraszt mikroszkópia segítségével tettem láthatóvá (Eclipse FN-1; Nikon). Az agyszeleteket tápláló oldat összetétele (mM-ban): 126 NaCl, 2.5 KCl, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, és 10 glükóz. A hőmérséklet 35 - 36°C volt a mérések során. Általános esetben a 'whole-cell patch clamp' mérésekhez magas [Cl⁻] tartalmú intracelluláris oldatot használtam. Azokban a kísérletekben, ahol diszinaptikus kapcsolatokat vizsgáltam, a posztzinaptikus sejt alacsony [Cl⁻] tartalmú intracelluláris oldattal volt elvezetve, ez lehetővé tette a serkentő és a gátló szinaptikus válaszok egyértelmű elkülönítését. Az elektrofiziológiai adatokat Multiclamp 700B erősítővel (Molecular Devices) és pClamp10 szoftverrel rögzítettem.

A felnőttkorban született szemcsesejteket születésükkor Moloney murine leukemia vírus vektor segítségével jelöltük meg. Az ismert korú szemcsesejtek egyedi fiziológiai tulajdonságait a 3-10. hetes koruk közt vizsgáltuk. Minden elvezetett sejtnak megmértük a konvencionális biofizikai tulajdonságait (bemenő ellenállás, membrán időállandó, AP küszöb-érték, az AP legnagyobb meredeksége, a sejtek maximális tüzelési rátája, és a teljes membrán kapacitása). Megmértük továbbá a sejtek serkenthetőségét, különböző frekvenciájú, fokozatosan növekvő amplitúdójú szinusz hullám áram-injektálás során. Az analízis során minden egyes felnőttkorban született szemcsesejtet egyedileg vizsgáltunk, tehát a hasonló korú sejtekben mért értékeket nem átlagoltuk.

A moharostok szinaptikus tulajdonságainak vizsgálatához páros elvezetéseket végeztem. Preszinaptikus partnerként direkt axonális elvezetéseket végeztem az óriás moha-terminálisokból, vagy a CA3 régió területén található szemcsesejteket használtam szomatikusan elvezetve. A szinaptikus válaszokat a CA3 régióban különböző interneuronokban valamint piramis

sejtekben vizsgáltam. A preszinaptikus protokoll, hogy a szemcsesejtek *in vivo* aktivitását modellezze, egyedi AP-okat, egyedi ‘burst’-öket (általában 15AP, 150Hz) és különböző hosszúságú inaktív periódusokat is tartalmazott. A ‘burst’ hatását az egyedi AP által kiváltott posztzinaptikus válaszokra úgy vizsgáltuk, hogy azok amplitúdójának ‘burst’ előtt mért értékét hasonlítottuk össze a ‘burst’ utánival, különböző idő elteltével. Moharost aktivitás közben, a piramis sejtekben mért a diszinaptikus gátló válaszok gyakoriságának mérésével a ‘feed-forward’ gátlósejt hálózat aktiválását közvetetten vizsgáltam. Hasonlóképpen diszinaptikus serkentő eseményeket is mértem interneuronokban, amik a köztes piramissejtek hatékony aktiválását mutatják a preszinaptikus szemcsesejt aktivitása közben.

A mérések során a sejteket biocitinnel töltöttem fel, és post hoc morfológiai analízis során azonosítottam.

4. Eredmények

A felnőttkorban született szemcsesejtek funkcionális érése:

Ph.D. munkám első felében a felnőtt korban született szemcsesejtek funkcionális érését vizsgáltuk, miután a hippokampusz hálózatába már beépültek, hogy megértsük a *fiatal* és az *érett* funkcionális állapotok közötti váltást. A retrovírus jelölésnek köszönhetően ismert korú szemcsesejteket vezettünk el 3-10 hetes koruk közt, és megvizsgáltuk a konvencionális biofizikai tulajdonságaikat, valamint a serkenthetőségüket. Azt találtuk, hogy a serkenthetőségi tulajdonságaik szerint a felnőttkorban született szemcsesejtek két jól elkülöníthető populációt képeztek. Az első csoport különösen *szenzitíven* válaszol bizonyos bemeneti-intenzitás tartományokra (ezért S-csoportnak neveztük), míg a második csoportot *lineáris* input-output tulajdonságok jellemezték (ezért L-csoportnak neveztük). Meglepő módon, ez a két integratív állapot az érési időszak teljes ideje alatt jelen volt, csak az érettként viselkedő (L-csoport) sejtek aránya nőtt a fejlődés előrehaladtával. Mindez arra utal, hogy a két állapot között az átmenet az

érés során pillanatszerűen történik, ugyanakkor egy meglehetősen széles időablakban mehet végbe.

Az S- és az L-csoport sejteinek serkentetősége közti különbség arra utal, hogy a két sejtpopuláció különböző funkciót tölthet be. Eredményeink szerint a csoportokon belül korban, és számos fiziológiai tulajdonságaik tekintetében is meglehetősen heterogén sejtek is betölthetnek azonos funkciót.

A szemcsesejt 'burst' tüzelésének hatása a CA3 hálózatban:

A Ph.D. munkám második felében a szemcsesejtek 'burst' tüzelésének hatását vizsgáltam a posztszinaptikus CA3 hálózatban. Egy újfajta szinaptikus plaszticitási jelenséget azonosítottunk a hippokampális moharost szinapszisokban, ami alapvetően befolyásolja az egyedi szemcsesejtek szinaptikus súlyát különböző fiziológiai aktivitásmintázatok során. Azt találtuk, hogy az egyedi moharost AP-ok által 'feed-forward' gátlósejtekben kiváltott posztszinaptikus válaszok jelentősen megnövekednek egyetlen rövid, nagy frekvenciájú 'burst' tüzelést követően. Meglepő módon a preszinaptikus 'burst'-nek nagyon hasonló hatása volt minden

posztzinaptikus 'feed-forward' gátlósejt típusban (beleértve az ivy sejteket, az axo-axonikus sejteket, a gyorsan tüzelő / parvalbumin expresszálo kosarsejteket, és a CCK expresszálo interneuronokat), de a burst nem váltott ki hasonló potenciációt posztzinaptikus piramis sejtekben, és a *septum*-ba vetítő spiny lucidum sejtekben (szerepük a lokális gátló hálózatban elhanyagolható).

Fontos megjegyezni, hogy jelentős potenciációt tapasztaltunk rövidebb, 3-5 AP (150 Hz) hosszúságú 'burst'-ök esetében is, valamint az is érdekes, hogy az általunk leírt jelenség dinamikus tartománya gyakorlatilag egybe esik az *in vivo* ismert 'burst' hossz tartománnyal (2-7 AP). A plaszticitási jelenségnek jellegzetes az időbeli lefutása, (amely különbözik a posztzetanikus potenciáció lefutásától), a hatás a 'burst' után körülbelül az első másodperc során fejlődik ki, ezután 6-8 másodpercig fennmarad mielőtt lecseng.

A moharostokban tapasztalt plaszticitási jelenség háttérben egyértelműen preszinaptikus folyamatok állnak, erre utal többek között, hogy a szinaptikus transzmisszió hatékonysága megnövekszik (ezzel összhangban csökken a 'failure rate' és a páros pulzus

arány). Meglepő módon eredményeink szerint a 'burst' során feltehetően nagy Ca^{2+} beáramlás nem kulcsfontosságú a potenciáció kialakulásához, mivel a 'burst' hatása csökkentett extracelluláris Ca^{2+} szint, valamint intracelluláris kalciumot megkötő EGTA jelenlétében is kialakul. Emellett számos különböző jelátviteli útvonal (PKA, PKC, PLC, Munc13, mGluR2/3/7) farmakológiai blokkolása mellett is megmarad a 'burst' által kiváltott potenciáció. Eredményeink arra utalnak, hogy a preszinaptikus 'burst' hatására szinaptikus vezikula ürülés egyik lépése, a 'priming' válik átmenetileg hatékonyabbá.

Diszinaptikus kapcsolatok segítségével indirekt módon teszteltük a fiziológiás szemcsesejt tüzelés során kialakuló plaszticitási jelenség hatását a posztzinaptikus CA3 sejtek moharost általi aktiválásában. A CA3 interneuronok posztzinaptikus partnereiben (CA3 piramissejtek) az egyedi AP-ra érkező diszinaptikus gátló válaszoknak jelentősen megnövekedett a gyakorisága a 'burst' után, ami egyértelműen jelezte a 'feed-forward' gátló hálózat hatékonyabb aktiválását. Ezzel ellentétben, posztzinaptikus gátlósejtekben mért diszinaptikus

serkentő események gyakorisága csak a 'burst' során növekedett meg, ami összhangban áll a moharost-piramis sejt szinapszisok már jól ismert rövidtávú plaszticitási tulajdonságaival.

A leírt szinaptikus folyamat lehetővé teszi a CA3 hálózat számára, hogy hosszabb távon is különbséget tegyen egy egyedi szemcsesejt AP és egy rövid, nagyfrekvenciájú 'burst' aktivitás között, mivel utóbbinak 8-10 másodpercig hatása lesz az adott szemcsesejt szinaptikus súlyára.

5. Következtetések

Doktori munkám eredményei hozzájárulnak egy különleges idegsejt típus, a *gyrus dentatus* szemcsesejtek működésének megértéséhez. Az alábbiakban tételesen foglalom össze a legfontosabb következtetéseket.

A felnőttkorban született szemcsesejtek funkcionális érése:

- A felnőttkorban született szemcsesejtek általános biofizikai tulajdonságainak érése folyamatos, ennek ellenére a serkenthetőségi tulajdonságaik az érés során két diszkrét állapotot vehetnek fel. A sejtek a *fiatal*, S-állapotban szenzitíven válaszolnak bizonyos bemeneti-intenzitási tartományban, míg az *érett*, L-állapotot lineáris input-output tulajdonságok jellemzik.
- A felnőttkorban született szemcsesejtek érése során mindkét integratív állapot jelen van egy meglepően széles időtartományban (5-9. hét), ezalatt az idő alatt az L-csoportba tartozó sejtek aránya nő.
- Annak ellenére, hogy az S- és L-csoportokba tartozó sejtek fiziológiai tulajdonságai (a változatos korokkal összehangban) meglehetősen különbözőek, egyes csoportokon belül a sejtek hasonló serkenthetősége képessé teszi őket azonos funkciók ellátására.

A szemcsesejt 'burst' tüzelésének hatása a CA3 hálózatban:

- A hippokampális moharostokban egy új plaszticitási folyamatot azonosítottunk. 'Feed-forward' gátlósejtekben a szemcsesejt egyedi AP tüzelésére érkező posztszinaptikus válasz megháromszorozódik másodpercekkel egy rövid, nagyfrekvenciájú 'burst' tüzelést követően. Szemcsesejt 'burst'-öt követően a hatás az első másodperc során alakul ki, majd 6-8 másodpercig fennmarad.
- A potenciációt már 2-7 AP-t (150 Hz) tartalmazó rövid 'burst'-ök is kiváltják, ez a tartomány megfelel a szemcsesejt *in vivo* ismert 'burst' hosszának.
- A potenciáció posztszinaptikus sejtípus specifikus jelenség, csak 'feed-forward' gátlósejtekben mérhető. A moharost 'burst' nem vált ki hasonló hatást a posztszinaptikus piramissejtekben és spiny lucidum sejtekben.
- A plaszticitási jelenség háttérében egyértelműen preszinaptikus folyamatok állnak. Eredményeink

arra utalnak, hogy a 'burst' hatására végbemenő preszinaptikus változások a vezikula 'priming' lépésnél történnek. Ezen változások függetlenek az általunk tesztelt, a preszinaptikus szabályozásban általánosan ismert molekuláris útvonalaktól.

- Preszinaptikus 'burst'-öt követően egyedi szemcsesejt AP-ok jelentősen hatékonyabban tudják megtüzelteni a 'feed-forward' gátlósejteket, tehát egyetlen szemcsesejt 'burst' képes alapvetően átrendezni a CA3 'feed-forward' hálózatot.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények:

Neubrandt M¹, Olah VJ¹, Brunner J, Szabadics J
Feed-forward inhibition is randomly wired from individual granule cells onto CA3 pyramidal cells. *HIPPOCAMPUS*. 2017 Jul 11.

¹ egyenlő mértékű hozzájárulás

Brunner J², Neubrandt M², Van-Weert S, Andrasi T, Kleine Borgmann FB, Jessberger S, Szabadics J
Adult-born granule cells mature through two functionally distinct states.

ELIFE. 2014 Jul 24;3:e03104.

² egyenlő mértékű hozzájárulás

Neubrandt M, Oláh VJ, Brunner J, Soltesz I, Szabadics J
Single bursts of individual granule cells rearrange feed-forward inhibition. *Átdolgozás alatt*.

Egyéb közlemények:

Róna G, Borsos M, Ellis JJ, Mehdi AM, Christie M, Környei Z, Neubrandt M, Tóth J, Bozóky Z, Buday L, Madarász E, Bodén M, Kobe B, Vértessy BG

Dynamics of re-constitution of the human nuclear proteome after cell division is regulated by NLS-adjacent phosphorylation.

CELL CYCLE. 2014;13(22):3551-64.

Brunner J, Ster J, Van-Weert S, András T, Neubrandt M, Corti C, Corsi M, Ferraguti F, Gerber U, Szabadics J
Selective Silencing of Individual Dendritic Branches by an mGlu2-Activated Potassium Conductance in Dentate Gyrus Granule Cells.

J NEUROSCI. 2013 Apr 24;33(17):7285-98.